

Resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en enterobacterias productoras de infecciones nosocomiales y caracterización preliminar de los plásmidos involucrados

María del Carmen González Osorio*, Aurelio Mendoza-Medellín*, Sergio Pavón Romero**, Roberto Becerril Plata*** y Andrea Vilchis Quiroz***

Recepción: 19 de enero de 2007

Aceptación: 23 de octubre de 2007

* Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Medicina, UAEM.

Correo electrónico: menmeau777@hotmail.com

** Laboratorio de Microbiología, Facultad de Química, UAEM.

*** Hospital para el Niño, IMIEM.

Resumen. Se estudiaron 68 cepas de enterobacterias productoras de infecciones nosocomiales, en su mayoría (63%) *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. El 40% fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación, en su mayoría a dos o tres de ellas. El 24% fueron resistentes a la única cefalosporina de cuarta generación ensayada. Casi todas las cepas resistentes a cefepima también lo fueron a las tres cefalosporinas de tercera generación ensayadas. El taxón con mayor frecuencia de cepas resistentes fue *K. pneumoniae* y la resistencia fue transferible *in vitro* en poco más del 50% de las cepas, pero en general no pasaron todos los marcadores de resistencia. Cada transconjugante presentó un solo plásmido y en 7 casos analizados mediante restricción se obtuvieron perfiles similares a pesar de tener patrones de resistencia diferentes.

Palabras clave: infecciones nosocomiales; plásmidos; resistencia a cefalosporinas, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*.

Resistanceto Third- and Fourth-Generation Cephalosporins in Eenterobacteria Producing Nosocomial Infections, and Preliminary Characterization of the Plasmids Involved.

Abstract. 68 strains of enterobacteria producing nosocomial infections were studied, most of them (63%) *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. 40% of the strains were resistant to 3rd-generation cephalosporins, mostly to 2 or 3 of them. 24% were resistant to the single 4th-generation cephalosporin assayed. Almost all of the strains resistant to cefepime were also resistant to the 3 third-generation cephalosporins used. *K. pneumoniae* turned out to be the taxon with the highest frequency of resistant strains. In more than 50% of resistant strains resistance was transferable *in vitro*, but in most cases some resistance markers did not transfer. Each transconjugant strain showed a single plasmid and 7 of them were analyzed by endonuclease restriction, yielding similar electrophoretic profiles in spite of representing four different resistance marker patterns.

Key words: nosocomial infections; plasmids; cephalosporin resistance, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*

Introducción

Los β -lactámicos son antibióticos bactericidas de amplio espectro que presentan una toxicidad muy baja para el organismo humano debido a que su modo de acción involucra su unión con enzimas que participan en la síntesis

de la pared celular de las bacterias, estructura que no tiene un equivalente en las células eucarióticas. Estos antibióticos incluyen compuestos bicíclicos y monocíclicos. Las penicilinas y las cefalosporinas integran el primer grupo, y los mono-bactámicos el segundo (Georgopapadakau, 1993).

La pared celular de las enterobacterias tiene una capa de *peptidoglicano*, un componente fundamental que confiere a la pared una gran resistencia mecánica que impide efectos osmóticos que podrían modificar seriamente el volumen bacteriano y por tanto su viabilidad. La fuerza del peptidoglicano depende de la transpeptidación, que es la formación de enlaces cruzados entre cadenas del polímero, la cual es catalizada enzimáticamente. Las cefalosporinas bloquean este proceso y dejan vulnerables a las bacterias a las alteraciones osmóticas inducidas por el medio, lo cual fácilmente las mata (Walsh, 2003).

El principal mecanismo de resistencia a los β -lactámicos en bacterias gram-negativas involucra a las β -lactamasas, enzimas periplásmicas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de dichos antibióticos, con lo cual éstos pierden su actividad.

Durante varias décadas desde que se masificó la utilización de los primeros β -lactámicos, aunque se generaron tasas crecientes de cepas resistentes, el espectro de sustratos de las β -lactamasas se mantuvo básicamente constante, es decir que cuando éstas se encontraban presentes en las poblaciones bacterianas actuaban inactivando a los antibióticos pioneros pero no a los que se iban desarrollando con el paso del tiempo.

De esta manera, a principios de los ochenta, las β -lactamasas conocidas hidrolizaban fácilmente a la ampicilina y virtualmente no actuaban sobre cefalosporinas de tercera generación (cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) ni sobre aztreonam (primer monobactámico producido) (Philippon *et al.*, 1989).

En 1983 se reportó en Alemania el aislamiento de una cepa de *Klebsiella ozaenae* con un plásmido que codificaba una β -lactamasa nueva, la cual era capaz de hidrolizar cefotaxima (Kliebe *et al.*, 1985).

Con el paso del tiempo se fueron encontrando otras β -lactamasas que conferían resistencia en grado variable a cefotaxima, ceftazidima y aztreonam pero que aún eran sensibles a imipenem y a cefamicinas. Estas enzimas fueron denominadas " β -lactamasas de espectro extendido". Sin embargo, posteriormente aparecieron formas más ampliadas en su espectro de sustratos, que actuaban sobre imipenem o sobre cefoxitina y otras cefamicinas (Kliebe, 1991).

El análisis molecular de algunas β -lactamasas de espectro extendido reveló que, comparadas con las enzimas originales, presentaban mutaciones que determinaban la alteración de la estructura primaria en una o en varias posiciones de la proteína (Billot-Klein *et al.*, 1990; Chanal *et al.*, 1994, Kliebe, 1991; Mabilat *et al.*, 1990) lo cual indicaba que las bacterias habían remodelado el sitio activo de las β -lactamasas que producían, de tal manera que ahora éstas eran capaces de reconocer a diversos sustratos nuevos que desde luego, mantenían cierta analogía químico-estructural con los antibióticos pioneros.

La diseminación de las β -lactamasas de espectro extendido ha ocurrido gracias a que los plásmidos que las codifican son autotransferibles y a que los genes correspondientes se encuentran en algunos casos formando parte de transposones. Los plásmidos son moléculas de DNA que contienen información genética generalmente no indispensable para la supervivencia de las bacterias, pero útil cuando éstas se encuentran en ciertos ambientes. Los plásmidos autotransferibles son capaces de pasar a bacterias que no los contienen mediante un mecanismo replicativo que permite la transferencia de una molécula a la bacteria receptora y la permanencia de otra en la donadora, de tal manera que las funciones codificadas en el plásmido pasan a otras bacterias sin que las pierda la donadora.

Los transposones son estructuras genéticas que tienen la capacidad de pasar de una molécula de DNA a otra y en caso de contener genes que codifican resistencia a algún antibiótico, este fenotipo tiende a diseminarse conforme el transposón se disemina. El efecto es muy eficiente debido a que en muchos casos la transposición es un proceso replicativo que permite la transposición de una copia a la molécula receptora y la permanencia de otra copia en el sitio original. La presencia de genes que codifican resistencia a antibióticos en transposones y la presencia de éstos en plásmidos autotransferibles son factores fundamentales que han condicionado la diseminación de genes de resistencia a antibióticos entre las bacterias en escala mundial, bajo el poder selector que representa el uso masivo de antibióticos.

El presente estudio tuvo como propósito principal detectar la presencia de cepas resistentes a cefalosporinas de tercera (cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) y cuarta (cefepima) generación en una población bacteriana productora de infecciones nosocomiales, así como identificar y caracterizar preliminarmente los plásmidos involucrados en dicho fenotipo.

1. Materiales y métodos

Cepas bacterianas. Se estudiaron cepas de enterobacterias productoras de infecciones nosocomiales que fueron obtenidas del Hospital Materno-Infantil del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMYM) y del Hospital para el Niño, del Instituto Materno Infantil del Estado de México (IMIEM), ambos en la ciudad de Toluca, Estado de México, en el periodo 2003-2004.

Como receptoras en las conjugaciones se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* J54 y J55, mutantes resistentes a ácido nalidixico y rifampicina, respectivamente. Ambas son

derivadas de la cepa J53, auxótrofa para prolina y metionina (Bachmann, 1972), es decir que solamente crece en presencia de dichos aminoácidos.

a) *Determinación de fenotipo resistente.* Las cepas fueron inoculadas en medio rico en presencia de concentraciones de antibióticos iguales a las que se obtienen en el suero sanguíneo con los tratamientos terapéuticos estandarizados (Yao y Moellering, 1999). Se utilizó la cepa de referencia ATCC 25922 como control. Las tres cefalosporinas de tercera generación ensayadas (cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) fueron obtenidas en Sigma-Aldrich, mientras que para el caso de cefepima se utilizó un producto comercial (Bristol-Myers).

b) *Conjugaciones.* Consisten en poner en contacto bacterias que contienen plásmidos que codifican resistencia a antibióticos (u otros marcadores reconocibles) con bacterias que no tienen dicha característica. Si los plásmidos son transferibles, se establecen uniones entre las bacterias donadoras y las receptoras y el plásmido pasa una copia de sí mismo a la receptora, conservándose la otra en la donadora. Al tiempo que ocurre la transferencia, cada copia forma su complementaria, quedando así estables. La transferencia de plásmidos de las cepas clínicas se hizo mezclando cultivos líquidos de las cepas donadoras y de la receptora J54, incubando de un día a otro (aproximadamente 20 horas) a 37 °C y seleccionando en medios sólidos con combinaciones apropiadas de antibióticos. Para las conjugaciones de retransferencia de los plásmidos a partir de las transconjugantes J54, se utilizó la cepa J55. Tanto el ácido nalidíxico como la rifampicina que se utilizaron fueron productos comerciales (Sanofi-Winthrop y Suipharm, respectivamente).

c) *Obtención de DNA plasmídico.* Consiste en generar un concentrado de bacterias, al cual se añade una sustancia capaz de romper las bacterias para que se libere su contenido. El DNA cromosómico se rompe en múltiples fragmentos por la manipulación mientras que el DNA plasmídico se puede recuperar precipitándolo con etanol. El procedimiento utilizado se basó en la aplicación de solución alcalina de dodecilsulfato de sodio (Sambrook *et al.*, 1989).

d) *Restricción de plásmidos.* Las enzimas de restricción son capaces de hidrolizar al DNA en donde éste presenta ciertas secuencias específicas. Cada enzima reconoce una secuencia y la hidroliza, de tal manera que un plásmido se romperá en tantos fragmentos cuantas secuencias blanco tenga para la enzima utilizada. El número y tamaño de fragmentos generados es diferente si los plásmidos son diferentes. Se utilizaron dos enzimas de restricción, EcoRI y HindIII (Invitrogen).

Las digestiones se llevaron a cabo en un lapso de una a dos horas en condiciones recomendadas por el fabricante.

e) *Electroforesis y visualización.* Las corridas electroforéticas se realizaron en una cámara horizontal, utilizando geles de agarosa (0.5 o 0.7%) de 10 x 7 cm, aplicando 50 V durante dos o tres horas, utilizando el amortiguador TAE (Sambrook *et al. bis*, 1989). Lo anterior con el propósito de separar los plásmidos –o los fragmentos de plásmidos en caso de restricciones– de acuerdo con su tamaño. En cualquier caso, las especies de menor tamaño tienen una mayor movilidad que las de mayor tamaño.

Los geles se pasaron posteriormente a solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL), dejándose ahí durante 30 minutos y luego se pasaron a agua destilada para lavarse durante al menos 2 horas. La visualización se llevó a cabo irradiando el gel con luz ultravioleta con un transiluminador (UVP). Al estimular al bromuro de etidio (intercalado en la doble cadena del DNA) éste emite una luz rojiza que permite visualizar las distintas especies de DNA que se encuentren en el gel, cada una de ellas en forma de una banda discreta. Se tomaron fotos mediante un sistema de fotodocumentación de geles Kodak DC290.

2. Identificación bioquímica

Se incluyeron en el estudio 68 cepas de enterobacterias productoras de infecciones nosocomiales. De ese total, 39 cepas fueron aisladas en el Hospital Materno-Infantil del ISSEMYM y 29 en el Hospital para el Niño, del IMEM, ambos ubicados en Toluca, Estado de México. La identificación bioquímica de todas las cepas se llevó a cabo mediante la batería de pruebas tradicionales para la identificación de enterobacterias. La tabla 1 muestra la distribución de identidades bioquímicas de las cepas incluidas en este estudio. Como puede observarse, a pesar de la variedad de taxones identificados, destacan por su frecuencia *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 1. Identidades bioquímicas de las cepas incluidas en el estudio.

| Identidad bioquímica | No. de cepas (%) |
|---------------------------------|------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 25 (36.8) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 18 (26.5) |
| <i>Klebsiella ozaenae</i> | 8 (11.8) |
| <i>Serratia marcescens</i> | 5 (7.4) |
| <i>Enterobacter amnigenus</i> | 4 (5.8) |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> | 3 (4.4) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 2 (2.9) |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | 1 (1.5) |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 (1.5) |
| <i>Salmonella typhi</i> | 1 (1.5) |

3. Resistencia a antibióticos

El ensayo para la detección de cepas resistentes a los antibióticos de interés arrojó los resultados que consigna la tabla 2. Como puede observarse, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación se halla más diseminada que la resistencia a cefepima, la cefalosporina de cuarta generación incluida en el estudio. Esto se relaciona con el tiempo de uso masivo, pues las de tercera generación se han utilizado durante más tiempo que las de cuarta.

Sin embargo, resulta bastante significativa la frecuencia de cepas resistentes a cefepima, pues ocurre en el 24% del total de cepas mientras que la resistencia a cefalosporinas de tercera generación se presentó en casi el 40% de las cepas.

Aunque la misma tabla contiene datos de frecuencia de presentación de la resistencia relacionados con las identidades bioquímicas, el número de cepas con cada identidad es muy baja en casi todos los casos, por lo cual no puede atribuírseles un significado real. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* es notoria la gran incidencia de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, en particular si se considera que de las 12 cepas resistentes, 11 presentaron resistencia a las tres cefalosporinas y sólo una a dos de ellas. En dicho taxón también sobresale la resistencia a cefepima.

Con una sola excepción, las cepas resistentes a cefepima lo fueron también a las tres cefalosporinas de tercera generación, siendo éste el patrón de resistencia más frecuente (tabla 3).

Tabla 2. Distribución de cepas resistentes a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en los diferentes taxones.

| Identidad | Núm. Cepas | Núm. R 3G ¹ (%) | Núm. R 4G ² (%) |
|---------------------------------|------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 25 | 4 (16) | 2 (8) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 18 | 12 (67) | 8 (44) |
| <i>Klebsiella ozaenae</i> | 8 | 3 (38) | 3 (38) |
| <i>Serratia marcescens</i> | 5 | 1 (20) | 1 (20) |
| <i>Enterobacter amnigenus</i> | 4 | 2 (50) | 1 (25) |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> | 3 | 3 (100) | 1 (33) |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 2 | 2 (100) | 0 (0) |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Salmonella typhi</i> | 1 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | 1 | 0 (0) | 0 (0) |

¹ Número cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación.

² Número cepas resistentes a cefalosporina de cuarta generación.

Tabla 3. Distribución de los distintos patrones de resistencia.

| Patrón de resistencia | No de cepas (%) |
|---|-----------------|
| Ct ^R Cx ^R Cz ^R Cp ^R | 16 (59.3) |
| Ct ^R Cx ^R Cz ^R | 6 (22.2) |
| Cx ^R Cz ^R | 2 (7.5) |
| Ct ^R Cx ^R | 1 (3.7) |
| Ct ^R Cz ^R | 1 (3.7) |
| Cx ^R Cz ^R Cp ^R | 1 (3.7) |

Ct^R, Cx^R, Cz^R y Cp^R = resistencia a cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima y cefepime, respectivamente.

4. Transferibilidad de la resistencia

Una vez identificados los marcadores de resistencia que presentaban las cepas analizadas, se procedió a implementar los experimentos de conjugación para determinar qué marcadores del perfil de resistencia de cada cepa eran capaces de ser transferidos a la cepa *Escherichia coli* J54, de genotipo conocido y ampliamente utilizada como receptora de plásmidos. Las mezclas de conjugación se incubaron a 37 °C de un día a otro y entonces se inocularon en medios selectivos que contenían ácido nalidíxico y cada una de las cuatro cefalosporinas (Nx Ct, Nx Cx, Nx Cz y Nx Cp). También se inocularon todas las cepas donadoras y la receptora en los mismos medios, como control del experimento. Realizado el proceso se encontró que en el medio que contenía ácido nalidíxico y ceftazidima la conjugación fue positiva en 15 de 27 casos en que la donadora contenía ese marcador de resistencia, correspondiendo a 55.5%. En cambio, en los otros medios selectivos la conjugación fue muy pobre pues la resistencia a cefotaxima sólo se transfirió en 2 de 24 casos (8.3%), la resistencia a ceftriaxona sólo se transfirió en 1 de 26 casos (4%) y la resistencia a cefepima no se transfirió en ningún caso de 17 cuyas donadoras contenían ese marcador de resistencia.

En cada una de las conjugaciones positivas se purificó por estría en el mismo medio cada cultivo transconjugante (formado por bacterias receptoras que habían adquirido el marcador de resistencia seleccionado).

Posteriormente, se ensayaron todas las transconjugantes en presencia de los antibióticos que no se habían utilizado para la selección de la conjugación. Por ejemplo, si una cepa clínica tenía resistencia a las 4 cefalosporinas y si la selección se había hecho con ceftazidima con resultado positivo, se inoculó la cepa transconjugante en medios que contenían por separado cefotaxima, ceftriaxona y cefepima, lo cual permitiría saber si hubo cotransferencia de alguno de los marcadores no seleccionados. Los resultados obtenidos se consignan en la tabla 4. Como puede observarse, en la mayoría de los casos de las transconjugantes seleccionadas con ceftazidima hubo cotransferencia de otros dos marcadores de resistencia, y en un número muy bajo de casos cotransfrieron uno o tres marcadores.

5. Marcadores ligados

El hecho de que se hayan cotransferido dos o más marcadores en una conjugación puede indicar que los marcadores se hallan en un mismo plásmido pero también puede ser el resultado de que durante el largo tiempo de conjugación hayan

sido transferidos 2 o más plásmidos conjugativos a la cepa receptora. Para definir esta disyuntiva, comúnmente se conjugan las cepas transconjugantes con otra cepa receptora a tiempos de incubación muy cortos, de unos cuantos minutos, y la mezcla de conjugación se diluye 1:10, 1:100 y 1:1000, inoculando en cajas con el medio selectivo apropiado alícuotas de 0.1 mL de cada dilución y de la mezcla sin diluir. Normalmente en alguna de estas diluciones se encuentra un número adecuado de colonias aisladas unas de otras, siendo cada una de ellas una transconjugante independiente. Posteriormente se prueba un buen número de estas colonias en medios con antibióticos no utilizados en la selección. Debido al muy corto tiempo de conjugación es muy improbable que si los marcadores se hallan en dos plásmidos, ambos pasen a cada bacteria receptora. De esta manera, si todas las colonias transconjugantes presentan un marcador no seleccionado, significa que éste se halla en el mismo plásmido que contiene al marcador seleccionado en la conjugación. Por el contrario, si sólo algunas de las colonias transconjugantes contienen un marcador no seleccionado, significa que éste no se halla en el mismo plásmido que contiene al marcador seleccionado.

Se intentó esta metodología conjugando las cepas transconjugantes que muestra la tabla 4 con la cepa *Escherichia coli* J55, pero por razones no definidas no se obtuvieron colonias transconjugantes a 10 minutos de conjugación. Extendiendo este tiempo se observó que el tiempo mínimo en que se obtuvieron colonias fue 8 horas. Al practicar el ensayo de marcadores no seleccionados se encontró que en todos los casos se reprodujeron los datos que presenta la tabla 4, por lo cual presumiblemente todos los marcadores de resistencia que exhibe cada cepa forman parte de un mismo plásmido.

6. Análisis de DNA plasmídico

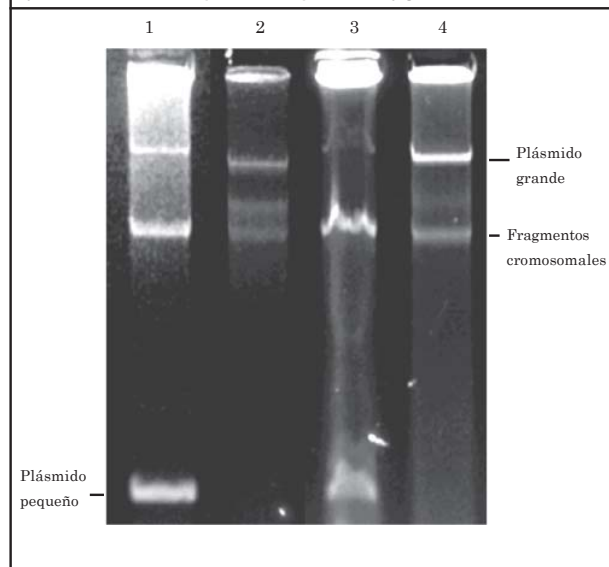
Se obtuvieron extractos de cultivos líquidos de las cepas originales y de sus transconjugantes, los cuales se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio para la detección física de plásmidos. En esta metodología, un plásmido se observa como una banda fluorescente de color rojizo cuando se irradia con luz ultravioleta. Generalmente se observan también una o dos bandas algo difusas que corresponden a restos de fragmentos cromosomales. Mientras mayor movilidad presenta una banda, implica un menor tamaño del plásmido, de manera que las bandas que se encuentran en la parte superior del gel son plásmidos grandes y las que se encuentran en la parte inferior corresponden a plásmidos pequeños. La figura 1 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos.

Tabla 4. Prueba de marcadores no seleccionados en la conjugación.

| Trasconjugantes | Ct ^R | Cx ^R | Cz ^R | Cp ^R |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| J54 (ISS19)Cz | - | + | + | - |
| J54 (ISS37)Ct | + | + | + | - |
| J54 (ISS37)Cz | + | + | + | - |
| J54 (ISS39)Cz | + | + | + | - |
| J54 (ISS40)Cz | - | + | + | - |
| J54 (ISS41)Cz | + | + | + | - |
| J54 (ISS43)Cz | - | - | + | - |
| J54 (ISS55)Cz | - | + | + | - |
| J54 (ISS56)Cz | - | + | + | - |
| J54 (ISS63)Cz | + | + | + | + |
| J54 (DIF3)Cz | - | - | + | - |
| J54 (DIF5)Cz | + | + | + | - |
| J54 (DIF25)Cz | + | + | + | - |
| J54 (DIF26)Ct | + | + | + | + |
| J54 (DIF26)Cz | + | + | + | + |
| J54 (DIF28)Cz | + | + | + | - |
| J54 (DIF29)Cz | + | + | + | + |

Los espacios en blanco indican pruebas no realizadas debido a que el marcador de resistencia no existía en la cepa donadora. Cada cepa transconjugante indica el antibiótico en que fue seleccionada.

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 0.5% en el que se corrieron extractos de DNA plasmídicos obtenidos de las siguientes cepas: 1. ISS63, 2. J54(ISS63)Cz, 3. ISS55, 4. J54(ISS55)Cz. En los carriles 1 y 3 se corrieron extractos de cepas clínicas y en los carriles 2 y 4 extractos de las correspondientes cepas transconjugantes.



El análisis de los gels indica que todas las cepas originales que transfirieron al menos un marcador de resistencia a la receptora J54 durante la conjugación, contienen al menos un plásmido de peso molecular elevado, en un intervalo estimado de 80-100 kb. En varios casos de cepas clínicas se observaron también bandas en la parte inferior de los gels. Los perfiles electroforéticos de las cepas clínicas no son tan claros como los de sus transconjugantes, lo cual es algo que se encuentra con frecuencia pues las cepas que se utilizan como receptoras de plásmidos son cepas de laboratorio que

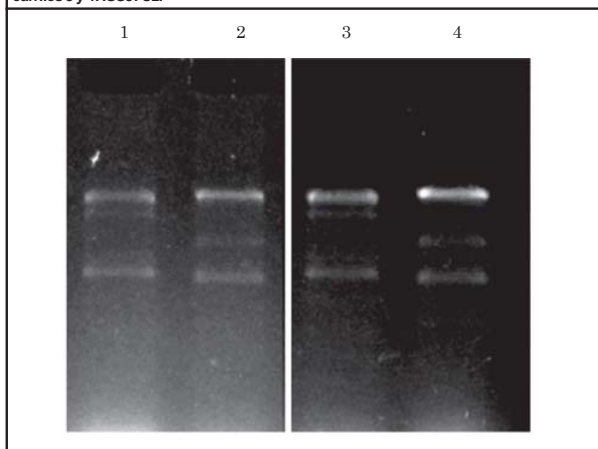
pierden fácilmente las proteínas con fenol-cloroformo durante la extracción del DNA. En las cepas clínicas no se pierden fácilmente las proteínas y su presencia produce efectos sobre la forma, nitidez y movilidad de las bandas de DNA. En la figura 1 se observa este efecto en las bandas de las cepas clínicas ISS63 e ISS55 (carriles 1 y 3, respectivamente). En el primer caso, la banda del plásmido grande tiene una movilidad menor a la del plásmido de su transconjugante (carril 2). Por su parte, las bandas de la ISS55 (carril 3) se distorsionaron de una manera muy ostensible. En ambos casos la alteración observada es atribuible a la presencia de proteínas en una proporción mayor a la que tienen los extractos de las transconjugantes. Como se observa en los carriles de éstas, las bandas son finas y nítidas. Obsérvese que solamente los plásmidos grandes aparecen en las transconjugantes correspondientes.

De cualquier manera, la evidencia es clara en el sentido de que en todas las transconjugantes aparece un plásmido grande y por lo tanto en él deben encontrarse los marcadores de resistencia que presentan de acuerdo con los datos de la tabla 4.

5. Restricción de plásmidos

En las transconjugantes la movilidad de los plásmidos grandes fue muy similar, por lo cual podría pensarse que se trataba de un mismo plásmido con diferentes marcadores de resistencia. Para tratar de definir si éste era el caso se eligieron cuatro plásmidos (ISS37Cz, ISS40Cz, ISS43Cz e ISS63Cz) con perfiles de resistencia diferentes (Ct^R-Cx^R-Cz^R; Cx^R-Cz^R; Cz^R y Ct^R-Cx^R-Cz^R-Cp^R, respectivamente). Dichos plásmidos se digirieron con dos enzimas de restricción por separado (EcoRI y HindIII)

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de extractos de plásmidos sometidos a restricción con EcoRI (carriles 1 y 3) y HindIII (carriles 2 y 4). Carriles 1 y 2: ISS40Cz; carriles 3 y 4: ISS37Cz.



y luego se sometieron a electroforesis en agarosa. La figura 2 muestra los resultados que se obtuvieron con dos de los plásmidos (ISS37Cz e ISS40Cz).

Como puede observarse, los perfiles de bandas de restricción para los dos plásmidos son similares al tratarse con la misma enzima. Los mismos perfiles de restricción resultaron al analizar los plásmidos ISS43 e ISS63, de manera que cuatro plásmidos con patrones de resistencia diferentes presentaron perfiles de restricción similares. Desde luego que esta información resultó inesperada pues de primera intención se esperaban perfiles diferentes.

Sin embargo, la similitud de los perfiles de restricción sugiere que los cuatro plásmidos se encuentran relacionados genéticamente y una posible explicación de los resultados obtenidos es que la presencia de 1-4 marcadores de resistencia no involucra diferencias tan grandes de cantidad de DNA para generar variaciones en la movilidad de las bandas.

Se probaron otros tres plásmidos (ISS19Cz, ISS55Cz e ISS56Cz) con el mismo patrón de resistencia de ISS40Cz, reproduciéndose los mismos perfiles de restricción que muestra la figura 2.

Discusión

Como en otros reportes de la literatura (Hoon *et al.*, 2004; Mulvey *et al.*, 2004), en nuestro estudio destacan *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* por la frecuencia con la que se presentan como agentes etiológicos de infecciones nosocomiales (tabla 1). Sin embargo es *Klebsiella pneumoniae* el taxón en el que se presentó con mayor frecuencia la resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación (tabla 2). Aunque no todos los marcadores de resistencia se transfirieron a la cepa receptora en los experimentos de conjugación, en todos los casos pasó solamente un plásmido de tamaño grande (movilidad por arriba de la banda de restos cromosomales), el cual contiene todos los marcadores de resistencia presentes en las transconjugantes (tabla 4). Al hacer las pruebas de ligamiento entre los marcadores de resistencia se encontró que es muy grande el tiempo necesario para detectar transconjugantes con estos plásmidos. Es algo que amerita mayor investigación pues en condiciones similares, otros plásmidos con marcadores de resistencia a antibióticos que hemos trabajado en el laboratorio, se transfieren tan rápidamente que en unos cuantos minutos pueden detectarse las transconjugantes. La causa no parece ser una diferencia en el tiempo de expresión fenotípica de los genes de resistencia una vez que el plásmido ha entrado a la cepa receptora, pues en experimentos con otros plásmidos (Mendoza-Medellín *et al.*, 2004) hemos utilizado ampicilina para la selección de

transconjugantes a tiempos muy cortos. La resistencia a ampicilina se presenta por β -lactamasas, igual que para las cefalosporinas, por lo cual no es probable que en un caso se requieran 5 minutos y en el otro 8 horas para expresar proteínas similares.

Otro aspecto que vale la pena seguir estudiando es el relativo a los resultados de las conjugaciones, pues al seleccionar con las distintas cefalosporinas prácticamente la única que generó resultados positivos fue ceftazidima, habiendo crecido transconjugantes en muy contados casos al seleccionar con los otros antibióticos, y de hecho en el caso particular de cefepima, en ningún caso se obtuvo un resultado positivo. Sin embargo, al caracterizar los plásmidos de las transconjugantes seleccionadas con ceftazidima se encontró que con este marcador cotransfirieron 1 a 3 marcadores no seleccionados, y más comúnmente 2 o 3. Se esperaba que los resultados de las conjugaciones primarias hubieran sido positivas al seleccionar con las cefalosporinas que cotransfirieron en las conjugaciones seleccionadas con ceftazidima.

Aun considerando los marcadores no seleccionados, en la mayoría de los casos las transconjugantes no presentaron todos los marcadores detectados en las cepas donadoras correspondientes, lo cual sugiere que algunos de esos marcadores se encuentran en otro replicón, pudiendo ser el cromosoma bacteriano o algún plásmido pequeño no transferible. En varias cepas que transfirieron marcadores de resistencia se observaron plásmidos pequeños en el análisis electroforético (figura 1).

En cuanto a la caracterización de los plásmidos, se eligieron siete plásmidos originalmente presentes en cepas de *Klebsiella pneumoniae* para ser digeridos por dos enzimas de restricción (EcoRI y HindIII). A pesar de que había representados cuatro patrones de resistencia a cefalosporinas en los siete plásmidos, todos produjeron un perfil de restricción similar. Es razonable pensar que debe haber diferencias en el tamaño de los fragmentos de restricción entre plásmidos con diferentes patrones de resistencia, sin embargo tales diferencias no se detectaron mediante la electroforesis en agarosa con las enzimas utilizadas. Probablemente con una enzima que corte los plásmidos en un número mayor de fragmentos puedan detectarse diferencias en la movilidad en alguno(s) de ellos. De cualquier manera, la similitud en los perfiles de restricción obtenidos sugiere una relación filogenética importante entre los siete plásmidos, pudiendo tratarse de un mismo plásmido con adiciones o deleciones de marcadores de resistencia.

La baja toxicidad de las cefalosporinas ha permitido su uso masivo durante muchos años. Las modificaciones químicas que se imprimieron hace varias décadas a las viejas cefalosporinas produjeron las llamadas de tercera genera-

ción y más recientemente las de cuarta generación, con resultados excelentes sobre numerosos microorganismos. Sin embargo, la capacidad adaptativa de éstos dio lugar una vez más a la aparición de bacterias mutantes capaces de sobrevivir en presencia de los nuevos medicamentos. Hoy en día, como lo documenta el presente estudio, entre las bacterias productoras de infecciones nosocomiales se ha diseminado de manera muy notable la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (40% de las cepas estudiadas) y ya es muy considerable la resistencia a cefepima, cefalosporina de cuarta generación (casi 25% de las cepas estudiadas). Sin duda es significativo el hecho de que dentro de la población de cepas resistentes, casi el 60% presenta resistencia a las cuatro cefalosporinas estudiadas (tabla 3). Una de las justificaciones de realizar este tipo de estudios es vigilar la eficiencia de los antibióticos que se utilizan en un hospital determinado. Cuando es elevada la proporción de cepas resistentes a un antibiótico, puede no ser prudente el seguir utilizándolo indiscriminadamente. Por ejemplo, en las cepas analizadas se observó que casi el 70% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* son resistentes a cefalosporinas de tercera generación y casi el 45% lo son a la de cuarta generación. Por lo tanto, no sería recomendable la administración de estos medicamentos cuando se identifica una infección nosocomial causada por alguna cepa de dicho taxón, a no ser que ya se tenga documentada la sensibilidad del microorganismo al antibiótico particular que se pretenda prescribir. En nuestro medio, la modulación del uso de los antibióticos con fundamento en estudios epidemiológicos en cada hospital es la única manera de optimizar el uso de estos medicamentos, lo cual redundará en mayor eficiencia de los tratamientos instituidos en los pacientes.

obre

Bibliografía

- Bachmann, B. (1972). "Pedigrees of Some Mutant Strains of *Escherichia coli*", *Bacteriol. Rev.* 36: 525-557.
- Billot-Klein, D.; L. Gutmann. y E. Collatz (1990). "Nucleotide Sequence of the SHV-5 β -lactamase Gene of a *Klebsiella pneumoniae* plasmid", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 34: 2439-2441.
- Chanal, C.; D. Sirot; H. Malaure; M. Poupart y J. Sirot (1994). "Sequences of CAZ-3 and CTX-2 Extended-spectrum β -lactamase Genes", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 38: 2452-2453.

- Georgopadakau, N. H. (1993). "Penicillin-binding Proteins and Bacterial Resistance to β -lactams", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37:2045-2053.
- Hoon, S.; I. Kwon; J. Hun; S. Ghyu; G. Ho; G. Ja; Y. Ho; B. Chul y S. Hee (2004). "Molecular Characterization of Extended-spectrum beta-lactamase Produced by Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean, nationwide survey", *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 2902-2906.
- Kliebe, A. A. (1991). "More-extended-spectrum β -lactamases". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35: 1697-1704.
- Kliebe, C.; B. A. Nies; J. F. Meyer; R. M. Tolxdorff-Neutzling y B. Wiedemann (1985). "Evolution of Plasmid-coded Resistance to Broad-spectrum Cephalosporins", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 28: 302-307.
- Mabilat, C.; S. Goussard; W. Sougakoff; R. C. Spencer y P. Courvalin, (1990). "Direct Sequencing of the Amplified Structural Gene and Promoter for the Extended-broad-spectrum β -lactamase TEM-9 (RHH-1) of *Klebsiella pneumoniae*", *Plasmid*. 23: 27-34.
- Mendoza-Medellín, A.; E. Curiel-Quesada y R. Camacho-Carranza (2004). "*Escherichia coli* R-factors Unstable in *Salmonella typhi* are Deleted Before Being Segregated in this Host", *Plasmid*. 51: 75-86.
- Mulvey, M.; E. Bryce; D. Boyd; M. Ofner-Agostini; S. Christianson; A. Simor y S. Paton (2004). "Ambler Class A Extended-Spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian Hospitals". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48: 1204-1214.
- Philippon, A.; R. Labia y G. Jacoby (1989). "Extended-spectrum β -lactamases", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33: 1131-1136.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning*, 2a. edición, C.S.H. Press, pp. 25-28
- Walsh, C. (2003). *Antibiotics, Actions, Origins, Resistance*. ASM Press. Chap. 3, pp. 23-50.
- Yao, J. D. C. y R. C. Moellering (1999). "Antibacterial Agents", en Murray, P. R.; E. J. Baron; M. A. Pfaller; F. C. Tenover and R. H. Tenover (eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 7a. edición, ASM Press, Washington, D. C., pp. 1495-1504.

Artículos de investigación

- Jorge Eliecer Ortega Montes
Crítica a las políticas de desarrollo regional en Colombia en el marco de la globalización: El caso del departamento de Córdoba
- Rocío del Carmen Serrano-Barquín
Hacia un modelo teórico-metodológico para el análisis del desarrollo, la sostenibilidad y el turismo
- José Briceño-Ruiz y Dyanna María Ruiz Uzcátegui
Políticas regionales compensatorias en el marco de la integración económica: reflexiones en torno al ALCA, los TLC y el Mercosur
- José Alejandro Vargas-Castro y Prudencio Oscar Mochi-Alemán
Estrategias que favorecen u obstaculizan el desarrollo local en el marco de la globalización
- Ignacio Kunz-Bolaños e Irma Guadalupe Romero-Vadillo
Naturaleza y dimensión del rezago habitacional en México
- Luis Felipe Beltrán-Morales, Magdalena Lagunas-Vázquez, José Urciaga-García y Alfredo Ortega-Rubio
Evaluación rural participativa: uso de los recursos naturales en la reserva de la biosfera del Vizcaíno, BCS, México
- Silvana Lara-Aldave e Ivonne Vizcarra-Bordi
Políticas ambientales-forestales y capital social femenino mazahua
- Lina Ojeda-Revah y Martha Ileana Espejel-Carbajal
La Cuenca Binacional Del Río Tijuana: Un Enfoque Biohistórico

Reseñas

- Mtro. Luis Rodríguez-Castillo
Neoinstitucionalismo en Ciencia Política. Libro reseñado: Shepsle, Kenneth A. y Mark S. Bonchek (2005), *Las fórmulas de la política. Instituciones, racionalidad y comportamiento*, Cide-Taurus-Santillana, México, 469 pp., ISBN 968-19-1365-5
- Ricardo Ángeles-Escobar
Dos visiones en debate. Libro reseñado: Cherem, Silvia S., (2006), Examen final: La educación en México (2000-2006), 2 tomos, CREFAL-El Equilibrista, México, 707 pp. ISBN I: 968-5011-71-0, II: 968-5011-72-9



Economía, Sociedad y Territorio
Núm. 26, Vol. VIII enero-abril 2008

Precio de lista por ejemplar \$113.00*
(Descuento en números anteriores)

SUSCRIPCIONES:

Suscripción anual (3 números): \$240.00 mn
Estados Unidos y Canadá us\$50.00
Centro y Sudamérica us\$50.00
Otros países us\$80.00

Solicítela a:

El Colegio Mexiquense, A.C.
Departamento de adquisiciones y librería
Apartado postal 48-D
Toluca 50120, México, MÉXICO
Teléfono: (722) 279 99 08 y 218 00 56 ext. 222
Fax: (722) 218 03 58 ext. 200
E-mail: ventas@cmq.edu.mx
Página-e: www.cmq.edu.mx